昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2012, 55(9): 1046 – 1053 ISSN 0454-6296

家蝇幼虫血淋巴抗真菌肽 MAF-1 的分子特性分析及其抗真菌作用

涂涛田[1], 季恒青[1], 国 果[2], 付 萍[2], 吴建伟[2,*]

(1. 重庆市疾病预防控制中心消毒与媒介生物控制所, 重庆 400042; 2. 贵阳医学院基础医学院, 贵阳 550004)

摘要: 制备家蝇 *Musca domestica* 幼虫血淋巴中的抗真菌肽, 对其分子特性及抗真菌机制进行研究。通过 C_{18} 柱固相萃取、反相高效液相色谱相结合的方法, 成功制备到家蝇幼虫血淋巴抗真菌肽 MAF-1。SDS-PAGE 分析结果表明, MAF-1 的分子量为 17.136 kDa。通过圆二色谱测出水溶液中 MAF-1 主要以 α 螺旋及 β 折叠为主。扫描电镜观察结果显示, MAF-1 作用白假丝酵母菌 *Candida albicans* 1 h 后, 部分真菌出现表面凸凹不平, 细胞结构模糊; 随着作用时间的延长, 表面形成很明显的凹陷, 皱缩, 个别菌体破裂, 内容物外泄, 病变真菌发生率高于对照组。单细胞凝胶电泳(single-cell gel electrophoresis, SCGE)结果显示, 正常对照组的真菌呈现典型的圆形, 而实验组则出现明显的拖尾现象即形成“彗星”样细胞特征, 细胞迁移距离明显高于对照组。SDS-PAGE 图谱显示, MAF-1 作用后的白假丝酵母菌菌体蛋白谱带一些条带明显变浅, 条带数下降, 甚至消失。结果提示 MAF-1 可能具有独特的抗真菌机制。

关键词: 家蝇; MAF-1; 圆二色谱; 单细胞凝胶电泳; 抗真菌机制

中图分类号: R384 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2012)09-1046-08

Characterization of the antifungal peptide MAF-1 from the hemolymph of *Musca domestica* larvae and its antifungal activity

TU Tao-Tian[1], JI Heng-Qing[1], GUO Guo[2], FU Ping[2], WU Jian-Wei[2,*] (1. Institute of Disinfection and Vector Control, Chongqing Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China; 2. School of Medicine, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract: To study the antifungal mechanism of *Musca domestica* antifungal peptide, MAF-1 was successfully prepared by solid phase extraction (SPE) and RP-HPLC from the hemolymph of *M. domestica* larvae. MAF-1 exists mainly as α-helices and β-sheets in aqueous solution, as revealed by analysis of circular dichroism spectra. The results detected by scanning electron microscopy showed that the membranes of some *Candida albicans* fungi were depressed, shrinked and ruptured at 1 h after treatment with MAF-1. The results of single-cell gel electrophoresis showed that the “comet”-like cells were observed in the experimental group; however, typical round fungi were found in the normal control group. SDS-PAGE analysis showed that some protein bands were significantly weaker, the number of bands decreased and some bands even disappeared when *C. albicans* was treated with MAF-1. The results suggest that MAF-1 may have a unique antifungal mechanism.

Key words: *Musca domestica*; MAF-1; circular dichroism spectra; single-cell gel electrophoresis; antifungal mechanism

昆虫是世界上最大的生物类群, 为适应各种不同的生存环境, 它们形成了独特的免疫系统, 即缺乏 B、T 淋巴系统, 不能产生免疫球蛋白和补体。近年来研究发现昆虫体内有许多活性物质, 如抗菌肽(antimicrobial peptide, AMP)就是典型代表(Hoffmann *et al*., 1999)。抗菌肽是生物机体在抵御病原微生物的防御反应过程中所产生的一类抗微生物与一些恶性细胞的短肽, 具有抗菌、抗原虫、抗病毒、抗真菌和抑制或杀伤肿瘤细胞等作用(Hancock, 2001; Koczulla and Bals, 2003)。

基金项目: 国家自然科学基金项目(30960343); 博士学科点专项基金[教技发中心函【2008】220]; 贵州省教育厅培育项目[黔科教(2009)0137]; 贵州省科技厅基金[黔科合【2010】3160]

作者简介: 涂涛田, 男, 1982 年生, 河南正阳人, 硕士, 研究方向为医学昆虫免疫学与病媒生物防制, E-mail: tuqian836@sohu.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wjw@gmc.edu.cn

收稿日期 Received: 2012-07-28; 接受日期 Accepted: 2012-09-09

目前，除吴建伟等（2002）和 Gu 等（2006）报道了家蝇 *Musca domestica* 幼虫血淋巴的抗真菌作用外，国内外对家蝇抗真菌肽的研究报道甚少。吴建伟等（2002）研究发现经大肠杆菌 *Escherichia coli* 诱导后的家蝇 3 龄幼虫血淋巴具有抑制白假丝酵母菌 *Candida albicans* 生长的活性；之后，本研究室从不同方面对其进行了更深入的研究。Fu 等（2009）采用固相萃取结合反相高效液相色谱的方法，成功从家蝇幼虫血淋巴中分离到一个属于家蝇组成性的新型昆虫抗真菌肽 MAF-1，其分子量为 17 203.384 Da。但对分离鉴定出的抗真菌肽结构及功能的关系及其如何作用于真菌等方面研究没有开展，加之昆虫抗真菌肽结构的多样性决定了它们功能和作用方式的多样性（徐进署和张双全，2002），不可能存在统一的作用模式来解释所有抗真菌肽的抗真菌机理。

目前已知的抗真菌肽对真菌的作用方式有：阻止或破坏真菌细胞壁的合成，如 Echinocandins；与膜作用，在质膜上形成空洞，使重要的内容物外泄，如 Cecropins；与真菌细胞内线粒体、核酸大分子等重要细胞器相互作用，最终导致真菌死亡，如 Histatins。例如，麻蝇抗真菌肽 AFP 可能与白假丝酵母菌表面的阴离子相互作用，引起细胞内容物的泄漏，但还没有确切的结构模型表明 AFP 能直接穿透细胞膜（Ekengren and Hultmark，1999）；heliomicin 的 cysteine-stabilized-α/β 基序为许多昆虫防御素族抗菌肽所共有，但它的抑菌活性不受盐离子浓度的影响，而可能有其他途径，譬如与靶细胞上的受体相互作用等（Landon *et al.*，1997；Lamberty *et al.*，2001）。目前国内外有关抗菌肽对细菌和肿瘤作用机制方面的研究比较多（金小宝等，2010），但未见家蝇幼虫血淋巴抗真菌肽抗真菌机制的研究，因此本实验首先对制备出的 MAF-1 进行结构分析，再利用扫描电镜观察细胞形态变化及单细胞凝胶电泳（SCGE）观察细胞内 DNA 损伤情况，初步探索出家蝇幼虫血淋巴抗真菌肽 MAF-1 的构效关系及其抗真菌机制。

1　材料与方法

1.1　虫种与菌株

驯化家蝇由贵阳医学院寄生虫学教研室 2000 年定种建立种群，在本实验室传代繁殖。幼虫饲养于麦麸中，成蝇以奶粉、白糖及清水为饲料，奶粉和白糖混合，清水另置，避免污染。饲养条件：温度 25 ± 1℃，相对湿度 50% ~ 60%，光周期 12L∶12D。白假丝酵母菌［*Candida albicans*（Robin）Berkhout，1923］［ATCC76615：氟康唑敏感株（09）］，由上海第二军医大学附属长征医院皮肤科提供，本实验室传代保种。

1.2　主要试剂与设备

乙腈（CAN），美国 Tedia 公司 HPLC 级；0.2% 氟康唑氯化钠注射液，扬子江药业集团有限公司，批号 07111501；低熔点琼脂糖，北京索莱宝科技有限公司分装，AMRESCO 产品；冷冻干燥系统，丹麦 Heto-Holten 公司；高效液相色谱（HPLC）系统，美国 Beckman 公司；S-3400N 扫描电镜，日本 Hitachi 公司；80i 荧光正置显微镜，日本 Nikon 公司。

1.3　家蝇幼虫血淋巴抗真菌肽 MAF-1 的制备

参照 Fu 等（2009）方法制备。取准备好的家蝇 3 龄幼虫，清水冲洗干净后，用滤纸将幼虫体表水分蘸干，分条剪去幼虫头部，收集血淋巴于冰浴的 eppendorf 管中。用 4℃ 超纯水将所收集的血淋巴稀释 10 倍，沸水浴 5 min，冷却 10 min，12 000 r/min，4℃ 离心 30 min 后，取上清液置 eppendorf 管中，冷冻干燥后将血淋巴粗提液测定蛋白浓度后取 2.5 mL 上柱，依次用 4 mL 含 0.05% TFA 的 0 ~ 60% 乙腈溶液分步洗脱。洗脱液冷冻干燥除掉乙腈和 TFA 后，取 50% 乙腈溶液固相萃取后洗脱组分，溶解于超纯水中后经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，100 μL 上柱（流动相 A：0.1% TFA 水溶液；B：0.1% TFA-ACN 溶液）。流速 0.8 mL/min，手工收集 280 nm 波长洗脱峰冻干后于 −20℃ 保存备用。

1.4　抗白假丝酵母菌活性检测

微量液体-菌落记数法（Iijima *et al.*，1993）：取无菌的 96 孔板，分别于每孔中加入对数生长期 09 株白假丝酵母菌液 50 μL，待测 0.391 mg/mL 的样品液 50 μL，使菌液终浓度为 10^6 cfu/mL。另设不加待测样品而加等量无菌蒸馏水孔为阴性对照，1 mg/mL 氟康唑为阳性对照。各孔充分混匀后置于 37℃ 恒温培养箱中培养 24 h。然后，从各孔中取出 2 μL 划线涂布在沙氏培养基表面，再置入 37℃ 培养 24 h 后，取出进行菌落计数。实验孔每次设置 3 个重复，实验重复 3 次。

1.5　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

参照 Schagger 和 von Jagow（1987）的方法进行 Tris-Tricine SDS-PAGE（吴冠芸等，2002）。分离胶

浓度16%，样品胶浓度10%，成层胶浓度4%，交联度3%。分别对家蝇幼虫血淋巴50%固相萃取洗脱组分、纯化的抗菌肽MAF-1进行SDS-PAGE分析。

1.6 MAF-1 二级结构分析

取0.5 mL超纯水，向其中加入0.1 mL MAF-1使其终浓度均为0.2 mg/mL，将样品送至中国科学技术大学生命科学实验中心进行圆二色谱分析。所用仪器JASCO J-810圆二色谱仪，参数设置：Scanning mode, Continuous; Data pitch, 1 nm; Sensitivity, Standard (100mdeg); Scanning speed, 100 nm/min; Bandwidth, 2 nm; Accumulation, 1; Range, 190 ~ 250 nm。

1.7 SDS-PAGE 观察 MAF-1 对真菌体内蛋白质的影响

配制沙氏培养基，准备浓度为1.0×10^6 cfu/mL的对数生长期白假丝酵菌菌液，在1 mL菌液中加入0.1 mL MAF-1使其终浓度为0.5 mg/mL，对照组加入等量pH 7.4的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)，继续培养18 h。反复用PBS (pH 7.4)洗涤实验组及对照组真菌，稀释各组样品至OD_{570}值基本相同后取200 μL离心，收集沉淀物进行Tris-Tricine SDS-PAGE电泳，通过电泳结果观察作用前后真菌蛋白条带的变化。

1.8 扫描电镜观察 MAF-1 对真菌形态的影响

取对数生长期的白假丝酵母菌，1 000 r/min离心10 min,弃上清，PBS(pH 7.4)洗涤，用PBS(pH 7.4)稀释成2×10^6 cfu/mL的真菌悬液。取1 mL真菌悬液，实验组加浓度为2 mg/mL的MAF-1 200 μL，对照组加PBS(pH 7.4)200 μL，37℃下作用0 h，1 h和4 h。2 000 r/min低温离心，弃上清，用PBS洗涤2次，加3% 戊二醛固定2 h，2 000 r/min离心5 min，弃上清，PBS(pH 7.4)漂洗2次，去上清，分别用50%，70%，80%，90% 和100% 无水乙醇脱水，2 000 r/min离心5 min后去上清，每次间隔15 min，将沉淀涂在载玻片上，自然干燥，离子溅射仪喷金(Hitachi 1010，真空：10 Pa，电流：15 mA，时间：100 s)，然后用扫描电子显微镜观察MAF-1对真菌的杀伤作用。

1.9 单细胞凝胶电泳法观察抗真菌肽对真菌 DNA 的影响

采用Singh和Stephens(1997)描述的SCGE操作方法。1)分离制备真菌悬液：将白假丝酵母菌菌悬液($2\sim3\times10^6$cfu/mL)与MAF-1(0.6 mg/mL)作用8 h后的液体离心后用PBS悬浮吹打成悬液，对照组不加MAF-1，而加入等量的pH 7.4的PBS。2)胶板制备：取100 μL于45℃水浴中保温的0.8%正常熔点琼脂糖，铺于磨沙载玻片上，形成底胶。盖玻片推匀，4℃凝固5 ~ 8 min。水平取下盖片，取100 μL于37℃水浴中保温的0.8% 低熔点琼脂糖与20μL菌悬液(约400个细胞)混匀，立即铺片，加上盖玻片，4℃凝固5 ~ 8 min。3)细胞裂解与电泳：将制备好的胶板去掉盖玻片后，浸于4℃预冷的细胞裂解液中，在4℃下裂解2.5 ~ 3 h。取出胶板，用双蒸水浸没漂洗后放入电泳槽中，浸泡在4℃预冷的电泳液中解旋20 min。4℃电泳20 ~ 25 min(25 V，300 mA)。4)中和与染色：电泳结束，将胶板浸泡于中和液中，每次10 min，共中和3次，最后晾干。取出胶板，置于染色缸中，在2 μg/mL的EB染色液中，暗处染色5 ~ 10 min。蒸馏水漂洗2次，每次5 min。5)镜检和分析：稍晾干，滤纸吸去多余水分，尽快在荧光显微镜下观察，绿光激发吸收滤片590 nm。照相记录，记数观察的细胞，计算核DNA迁移距离，使用单细胞凝胶电泳软件分析所有照片，随机测量20个以上细胞的尾长、尾矩和椭圆矩，以这些指标的算术均数代表个体DNA损伤情况。

1.10 数据统计与分析

采用SPSS17.0统计软件进行数据分析，实验数据以平均值 ± 标准差表示，两组间均数比较采用*t*检验，多组均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 MAF-1 的提取和高效液相色谱分析

用RP-HPLC分析由方法1.3获得的固相萃取50%乙腈洗脱组分，发现在31.85 min处出现一响应值较高、分离度较好的蛋白峰(图1)，根据Fu等(2009)初步确定其为MAF-1；此峰在220 nm和280 nm波长有较高吸收值(图2)。

2.2 MAF-1 的抗真菌活性

50%乙腈萃取洗脱组分经RP-HPLC分析，在31.85 min处洗脱的蛋白峰抗真菌效果表明(图3)，MAF-1活性强而稳定，与阴性对照相比的差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 MAF-1 的 SDS-PAGE 分析

经SDS-PAGE分析(图4)，50%乙腈萃取洗脱组分在电泳图上呈现5条不同条带，而经高效液相色谱分离后的蛋白峰即MAF-1仅在标准分子量

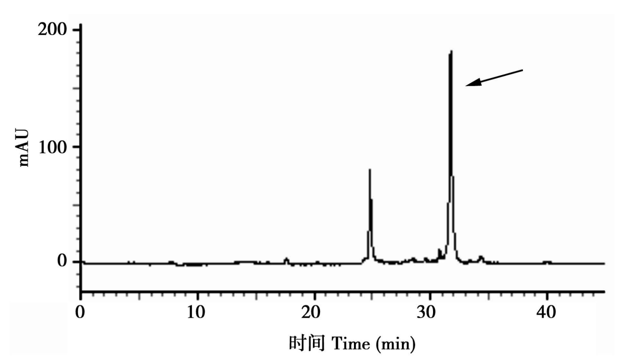


图 1　50% 乙腈萃取组分的 RP-HPLC 色谱图

Fig. 1　RP-HPLC peaks of fractions eluted with 50% acetonitrile

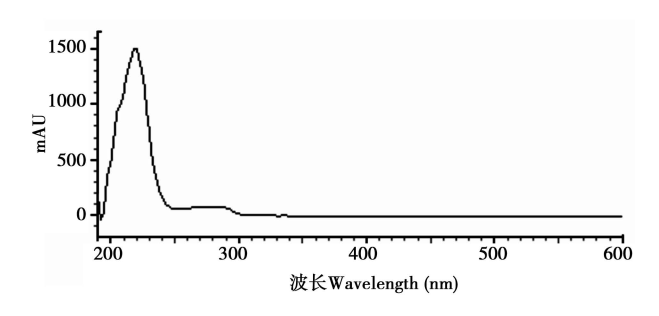


图 2　家蝇抗菌肽 MAF-1 的紫外吸收光谱

Fig. 2　The UV absorbance spectrum of MAF-1 from *Musca domestica*

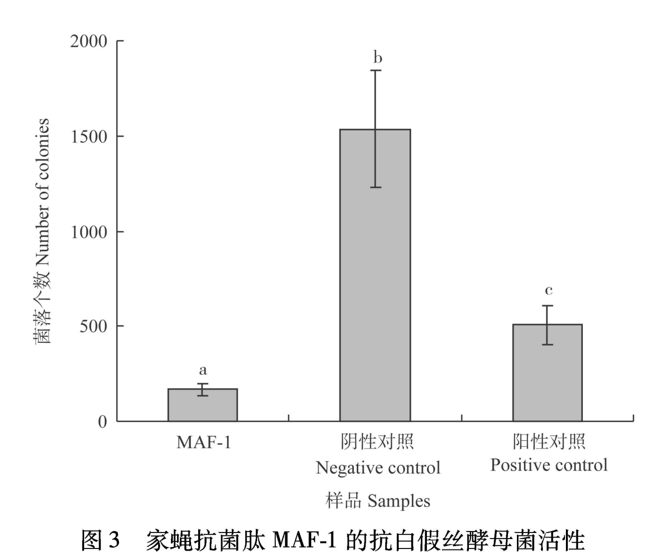


图 3　家蝇抗菌肽 MAF-1 的抗白假丝酵母菌活性

Fig. 3　Antifungal activity of MAF-1 from *Musca domestica* against *Candida albicans*

图中数值为均数 ± 标准差；图柱上不同字母表示差异显著（*t* 检验，$P < 0.05$）。The data in the figure are mean ± *SD*. Different letters above bars indicate significant difference (*t*-test, $P < 0.05$).

14.4 kDa 与 20.1 kDa 之间有一清晰蛋白条带。用蛋白质分子量标准来检测 MAF-1 的分子量，根据标准曲线计算，MAF-1 的分子量为 17.136 kDa。

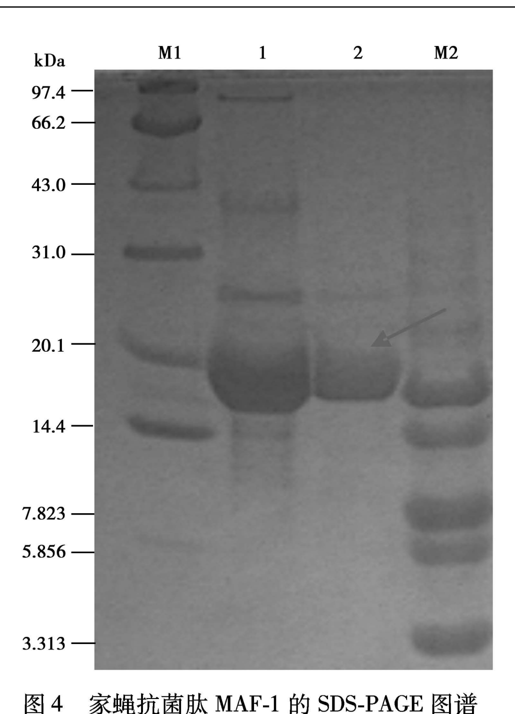


图 4　家蝇抗菌肽 MAF-1 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 4　SDS-PAGE electrophoresis of the antifungal peptide MAF-1 from *Musca domestica*

M1：低分子量标准蛋白 Low molecular weight marker；M2：超低分子量标准蛋白 Ultra-low molecular weight marker；1：50% 乙腈萃取洗脱组分 Fractions eluted with 50% acetonitrile；2：家蝇抗菌肽 MAF-1.

50% 乙腈萃取洗脱组分经 RP-HPLC 分析，经比较出峰时间、紫外光谱峰形、活性检测以及电泳条带，与 Fu 等(2009)所得结果一致，即 MAF-1，故收集此物质做后续实验。

2.4　MAF-1 的圆二色谱分析

MAF-1 在水溶液中的圆二色谱检测结果见图 5。水溶液中 MAF-1 主要以 α 螺旋(31.6%)及 β 折叠(32.6%)为主，无规卷曲(28.8%)的构象也存在，而 β 转角(7.1%)较少。

2.5　SDS-PAGE 分析真菌蛋白变化

电泳图谱显示(图 6)，正常白假丝酵母菌菌体蛋白，在 97.4 ~ 14.4 kDa 区域有明暗不同，分布清晰的多条电泳条带；处理后的白假丝酵母菌条带染色浅，条带数下降；对照组(-)和实验组(+)相比较共有 4 个蛋白条带发生较明显的变化。与对照组比较，箭头所指(从上而下)的第 1，2 和 3 条带实验组颜色较浅；第 4 条带对照组有而实验组几乎看不清。这种蛋白条带明显改变的现象，提示 MAF-1 作用后菌体蛋白正常表达量有一定的改变。

2.6　电镜观察 MAF-1 对真菌形态的影响

扫描电镜观察结果显示：未经 MAF-1 作用的白假丝酵母菌结构完整，呈卵圆形，有芽体，外观

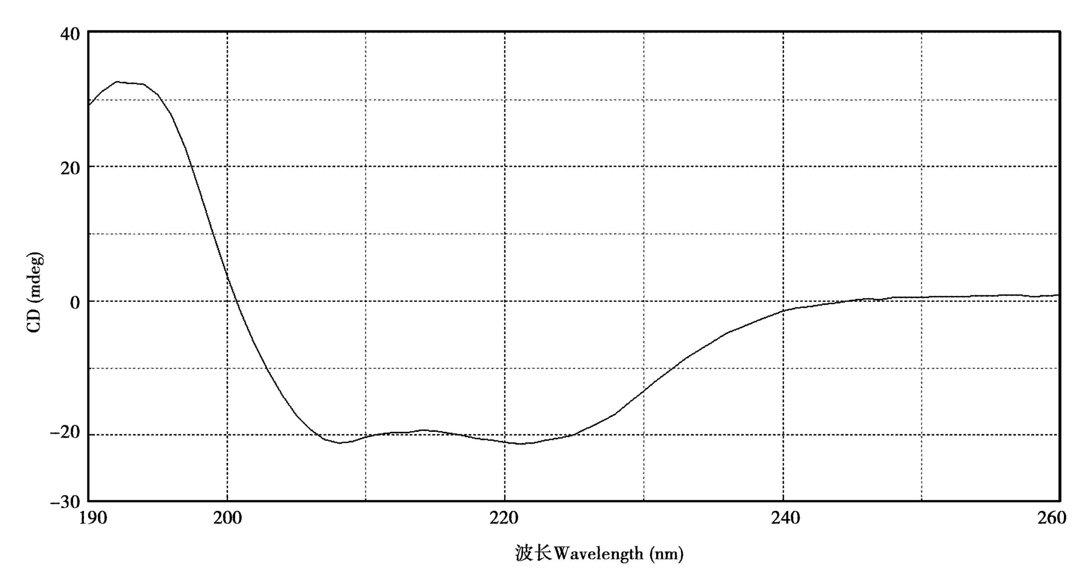


图5 家蝇抗菌肽 MAF-1 的圆二色谱

Fig. 5 Circular dichroism spectra of antifungal peptide MAF-1 from *Musca domestica*

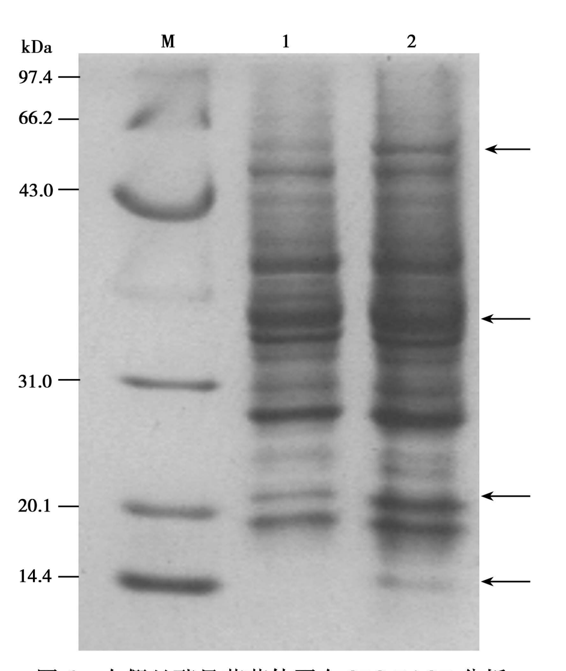


图6 白假丝酵母菌菌体蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE electrophoresis of proteins from *Candida albicans*

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker；1：正常真菌蛋白 Proteins of normal *C. albicans*；2：MAF-1 作用后的真菌蛋白 Proteins of *C. albicans* treated by MAF-1.

饱满，表面光滑（图7：A，D），而经 MAF-1 作用1 h 后的部分真菌出现结构异常（图 7：B，C），表面凸凹不平，细胞结构模糊；随着 MAF-1 作用时间的延长，作用4 h 后细胞形态有较大改变，表面形成很明显的凹陷，皱缩，个别菌体破裂，原生质严重扩散，内容物外泄（图 7：E，F）。

表1 结果表明，实验组 MAF-1 作用白假丝酵母菌后，病变真菌发生率均高于正常对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

2.7 SCGE 观察抗真菌肽对真菌 DNA 的影响

正常对照组的白假丝酵母菌呈现典型的圆形或椭圆形（图 8：A），而实验组出现明显的拖尾现象即形成“彗星”样细胞特征，即很小的彗星头，大而圆的彗星尾（图 8：B），细胞迁移距离明显高于对照组。

表2 结果表明，实验组（0.6 mg/mL）MAF-1 作用白假丝酵母菌 8 h 后，真菌细胞尾长（tail length）、尾矩（tail moment）、椭圆矩（olive moment）均显著高于正常对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

3 讨论

电子显微镜是根据电子光学原理，用电子束代替光束，用电磁透镜代替玻璃透镜，使被观察物质的细微结构在非常高的放大倍数下成像的一种显微观察装置，因此能清楚地观察到白假丝酵母菌的细胞壁、细胞膜等结构。真菌细胞壁是菌细胞最外层结构，其在维持真菌形态及胞内高渗状态起着极为重要的作用，已成为一个新的作用靶点（蒋庆锋等，2003）。本实验通过扫描电镜观察 MAF-1 作用后的部分真菌出现结构异常，表面有很明显的凹陷，皱缩，个别菌体破裂，内容物外泄，细胞呈“空壳”状。

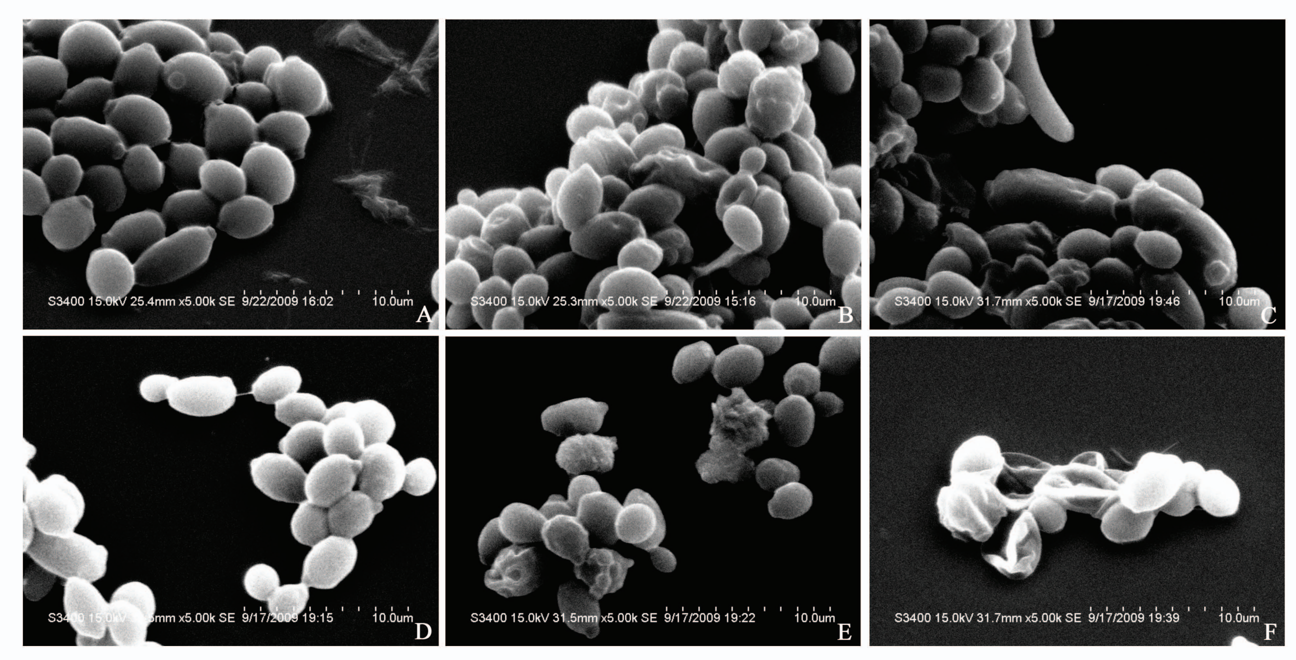


图 7　MAF-1 作用于白假丝酵母菌前后的扫描电镜观察

Fig. 7　Observation of *Candida albicans* before and after treatment with MAF-1 by scanning electron microscope

A, D：正常白假丝酵母菌 Normal *C. albicans*；B,C：MAF-1 作用 1 h 后的白假丝酵母菌 *C. albicans* at 1 h after treatment by MAF-1；E, F：MAF-1 作用 4 h 后的白假丝酵母菌 *C. albicans* at 4 h after treatment by MAF-1.

表 1　3 组白假丝酵母菌的电镜观察

Table 1　Observation of *Candida albicans* in three groups by scanning electron microscope

组别 Group	视野数(个) Number of visions	病变真菌发生率(%) Incidence of injured fungi
对照组 Control group	15	2.19 ± 0.17
实验组(作用 1 h) Experimental group (1 h after treatment)	15	22.16 ± 3.52*
实验组(作用 4 h) Experimental group (4 h after treatment)	15	28.89 ± 7.65*

表中数值为平均值 ± 标准差(n = 15)。The data in the table are mean ± *SD* (n = 15). * 与阴性对照相比差异显著($P < 0.05$) Significant difference from negative control ($P < 0.05$). 病变真菌发生率 Incidence of injured fungi (%) = 单个视野下受损伤的真菌个数 Number of injured fungi/单个视野下可观察的真菌总数 All fungi in a vision field.

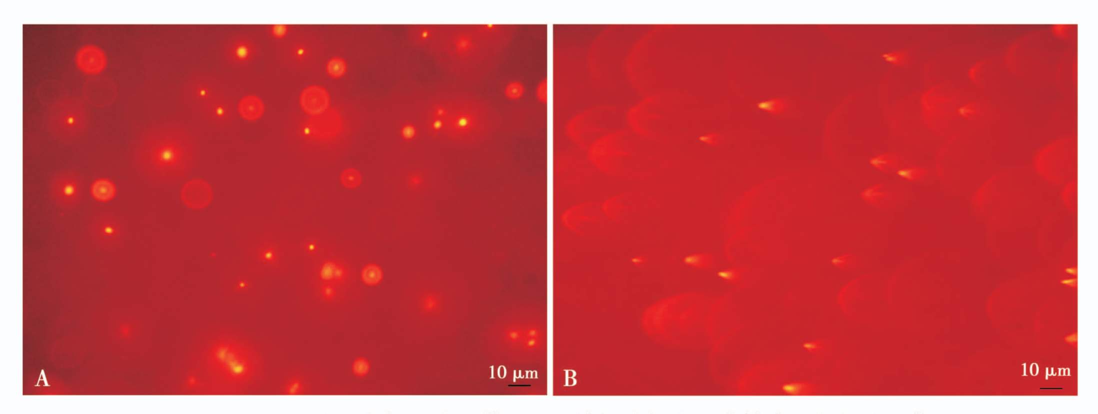


图 8　MAF-1 处理白假丝酵母菌 8 h 后单细胞凝胶电泳技术所得细胞图像

Fig. 8　Cellular images of SCGE assays from *Candida albicans* exposed to MAF-1 for 8 h

A：正常白假丝酵母菌单细胞 Normal *C. albicans*；B：0.6 mg/mL MAF-1 作用白假丝酵母菌 8 h 后的单细胞 *C. albicans* treated by 0.6 mg/mL MAF-1 for 8 h.

表 2 3 组白假丝酵母菌 DNA 的损伤情况

Table 2 DNA damage of *Candida albicans* in three groups

组别 Group	尾长 Tail length (μm)	尾矩 Tail moment (μm)	椭圆矩 Olive moment (μm)
对照组 A Normal control group A	3.21 ± 0.80	0.37 ± 0.23	0.29 ± 0.11
实验组 B Experimental group B	48.17 ± 7.81 *	26.30 ± 6.97 *	15.43 ± 3.42 *

表中数值为平均值 ± 标准差(n = 20)。The data in the table are mean ± *SD* (n = 20). * 与阴性对照相比在 0.01 水平上差异显著 Significant difference from negative control group at the 0.01 level.

经统计发现实验组病变真菌发生率明显高于对照组。以上变化表明 MAF-1 对白假丝酵母菌的细胞壁、细胞膜可能有一定的破坏作用，这与我们在抗真菌活性评价中的结果相一致。但 MAF-1 对白假丝酵母菌的抗菌作用可能也存在着其他更广泛的抗菌作用机制，其具体的作用机制还有待进一步通过实验来验证。

单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE)，又称彗星试验(comet assay)，是近年来由 Ostling 和 Johanson (1984) 建立，经 Singh 和 Stephens(1997)改进的用于检测有核细胞 DNA 损伤的技术，可在单个细胞水平上检测 DNA 损伤和修复。本实验已发现 MAF-1 对白假丝酵母菌细胞 DNA 有损伤作用，实验组出现明显的拖尾现象即形成“彗星”样细胞特征，即很小的彗星头，大而圆的彗星尾。目前运用单细胞凝胶电泳技术检测抗真菌肽对白假丝酵母菌细胞的毒性作用至今还未见有报道。该研究结果说明，单细胞凝胶电泳技术可以快速灵敏地检测 MAF-1 在白假丝酵母菌细胞中的毒性作用，MAF-1 对病原生物的损伤作用在不同类型细胞中可能存在一定普遍性。

SDS-PAGE 电泳分析结果表明，MAF-1 作用后的白假丝酵母菌菌体蛋白谱带一些条带明显变浅，条带数下降，甚至消失，提示 MAF-1 可能抑制某些菌体蛋白的合成，也可能与菌体内蛋白结合，使其蛋白构成发生变化。这与单细胞凝胶电泳实验结果中对真菌 DNA 的损伤情况相符合，推测可能影响菌体的基因表达以及蛋白质的代谢，与前期 Kim 等(2007)、Galanth 等(2009)研究结果一致。

总结上述结果，我们发现 MAF-1 与一般化学药物氟康唑抗真菌机理不同，氟康唑只作用于细胞膜，其作用机制主要是高度选择性干扰真菌的细胞色素 P-450 的活性，从而抑制真菌细胞膜上麦角固醇的生物合成。而 MAF-1 作用靶点则更加广泛，由此推断 MAF-1 对白假丝酵母菌的可能作用过程为：MAF-1 通过静电引力首先与细胞外膜结合，使光滑的真菌表面有许多凹陷，细胞壁逐渐裂解；改变了细胞膜的通透性，在细胞膜上形成了许多孔道，致使细胞内的原生质扩散，引起菌体皱缩，塌陷；MAF-1 可能造成真菌体内 DNA 损伤，进而影响细胞生长相关的某些蛋白的合成，最终造成真菌死亡。但 MAF-1 是否通过孔道进入细胞内进一步影响细胞的信号传导体系以及如何影响基因的表达？或者通过破坏真菌细胞膜，其他物质进入从而引起真菌蛋白质的合成？这些问题还需更深入的研究。总之，抗真菌肽有可能作为一种新的替代抗生素的抗真菌药物，并且不具有一般抗真菌药物对真菌耐药性的特性，因此对家蝇抗真菌肽深入研究具有重要理论意义和实际应用价值(Lata *et al.*, 2007)。

参考文献(References)

Ekengren S, Hultmark D, 1999. *Drosophila* cecropin as an antifungal agent. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 965 – 972.

Fu P, Wu JW, Guo G, 2009. Purification and molecular identification of an antifungal peptide from the hemolymph of *Musca domestica* (housefly). *Cellular & Molecular Immunology*, 4(6): 245 – 252.

Galanth C, Abbassi F, Lequin O, Ayala-Sanmartin J, Ladram A, Nicolas P, Amiche M, 2009. Mechanism of antibacterial action of dermaseptin B2: interplay between helix-hinge-helix structure and membrane curvature strain. *Biochemistry*, 48(2): 313 – 327.

Gu LJ, Wu JW, Su XQ, Su CK, 2006. Isolation and purification of novel anti-fungal peptides from hemolymph of immunized larvae of housefly, *Musca domestics*. *Journal of Life Science*, 16(3): 387 – 395.

Hancock REW, 2001. Cationic peptide: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 1: 156 – 164.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA, 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(2): 1313 – 1318.

Jiang QF, Zhou YJ, Sheng CQ, Wang JZ, 2003. Advances in the research of antifungal drugs that act at fungal cell wall. *Chin. Pharm. J.*, 38(6): 410 – 412. [蒋庆锋, 周有骏, 盛春泉, 王金政, 2003. 作用于真菌细胞壁的抗真菌药物的研究进展. 中国药学杂志, 38(6): 410 – 412]

Jin XB, Zhu JY, Mei HF, Shen J, Li XB, Ma Y, Chu FJ, Lu XM, 2010. Proteomic study of the effort of antimicrobial peptides

cecropin on human hepatocelluar carcinoma cell BEL-7402. *Biotechnology*, 20(6): 44 – 46. [金小宝，朱家勇，梅寒芳，沈娟，李小波，马艳，褚夫江，卢雪梅，2010. 蛋白组学研究抗菌肽对 BEL-7402 细胞的作用. 生物技术，20(6): 44 – 46]

Kim JS, Jang S, Kim U, Cho K, 2007. AFM studies of inhibition effect in binding of antimicrobial peptide and immune proteins. *Langmuir*, 23(21): 10438 – 10440.

Koczulla AR, Bals R, 2003. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs*, 63: 389 – 406.

Lamberty M, Zachary D, Lanot R, Bordereau C, Robert A, Hoffmann JA, Bulet P, 2001. Constitutive expression of a cysteine-rich antifungal and a linear antibacterial peptide in a termite insect. *J. Biol. Chem.*, 276(6): 4085 – 4092.

Landon C, Sodano P, Hetru C, Hoffmann J, Ptak M, 1997. Solution structure of drosomycin, the first inducible antifungal protein from insects. *Protein Science*, 6(9): 1878 – 1884.

Lata S, Sharma BK, Raghava GPS, 2007. Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics*, 8(1): 263 – 266.

Iijima R, Kurata S, Natori S, 1993. Purification, characterization, and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae. *J. Biol. Chem.*, 268 (16): 12055 – 12061.

Ostling O, Johanson KJ, 1984. Microel ectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (123): 37 – 40.

Schagger H, von Jagow G, 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166: 368 – 379.

Singh NP, Stephens RE, 1997. Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mut. Res.*, 383: 167 – 175.

Wu GY, Pan HZ, Wu H, 2002. Common Data Manual of Biochemistry and Molecular Biology Experiments. Science Press, Beijing. 190 – 192. [吴冠芸，潘华珍，吴翚，2002. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京：科学出版社. 190 – 192]

Wu JW, Wu JH, Yang HP, Yang Y, 2002. Preliminary studies of the antifungal activity of hemolymph of the housefly. *Chinese Journal of Zoonoses*, 18(3): 57 – 59. [吴建伟，吴健桦，杨鹤萍，杨杨，2002. 家蝇幼虫血淋巴抗白念珠菌作用的初步研究. 中国人兽共患病杂志，18(3): 57 – 59]

Xu JS, Zhang SQ, 2002. Advances in the research of the functions of insect antibacterial peptides against pathogenic organisms. *Acta Entomologica Sinica*, 45 (5): 673 – 678. [徐进署，张双全，2002. 昆虫抗菌肽对病原微生物作用的研究进展. 昆虫学报，45(5): 673 – 678]

（责任编辑：赵利辉）